

University of Groningen

Antiperinucleaire factor; een nieuwe serologische reactie voor de diagnostiek van reumatoïde artritis

Nienhuis, Roelof Lydius Fokke

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
1965

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Nienhuis, R. L. F. (1965). *Antiperinucleaire factor; een nieuwe serologische reactie voor de diagnostiek van reumatoïde artritis*. Koninklijke Van Gorcum.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt een onderzoek beschreven dat werd verricht naar de aard en het voorkomen van een tot dusver onbekende factor in het serum van bepaalde patienten.

In hoofdstuk I wordt een overzicht gegeven van de gebruikte methoden en materialen. De uitvoering van de immunofluorescentietechniek, waarbij als substraat slijmvliesepitheelcellen van menselijke wangen worden gebruikt, is uitvoerig beschreven.

Het bleek dat met bepaalde sera een typische fluorescentie werd gezien van korreltjes in het cytoplasma van deze epitheelcellen. Op grond van de lokalisatie van deze 0,5 tot 4 μ grote, korreltjes, noemden wij dit verschijnsel perinucleaire fluorescentie (PNF). De factor in het patientenserum die kennelijk verantwoordelijk was voor het tot stand komen van deze reactie werd antiperinucleaire factor (APF) genoemd.

De reproduceerbaarheid van de methode is, in onze handen, volledig.

In hoofdstuk II wordt het voorkomen van de antiperinucleaire factor in sera van verschillende groepen patienten en controlepersonen beschreven. Het bleek dat de factor speciaal voorkomt bij patienten met reumatoïde artritis en wel in ongeveer 50% van de gevallen (tabel I).

Bij de andere onderzochte groepen bleek de factor niet of vrijwel niet voor te komen (ongeveer 1%). Een uitzondering vormen misschien patienten met pernicieuse anaemie en familieleden van patienten met reumatoïde artritis.

In hoofdstuk III wordt het onderzoek beschreven dat werd verricht om een mogelijk verband aan te tonen tussen het bezit van de antiperinucleaire factor en het geslacht of de leeftijd van de reumapatienten of met het bezit van reumatoïde noduli en positieve reumaseroïogische reacties.

Het bleek dat het geslacht van de patient niet van invloed was op het aanwezig zijn van de factor. Bovendien bleek de antiperinucleaire factor

evenredig verdeeld te zijn over de verschillende leeftijdsgroepen. Er bleek een duidelijk verband te bestaan tussen het aanwezig zijn van de antiperinucleaire factor enerzijds en de aanwezigheid van reumatoïde noduli en van positieve reumareacties anderzijds.

De antiperinucleaire factor bleek bij patienten met noduli vaker aanwezig te zijn dan de reumafactoren.

De reeds uit de literatuur bekende positieve correlatie tussen de aanwezigheid van noduli en het positief zijn van de serologische reumareacties kon worden bevestigd.

In hoofdstuk iv wordt het onderzoek naar de aard van de antiperinucleaire factor beschreven. Uit de experimenten bleek dat waarschijnlijk een relatief thermostabiele factor van complement voor het tot stand komen van de reactie tussen de antiperinucleaire factor en de intracellulaire granula noodzakelijk was.

Na een kort overzicht over de verschillende immunoglobulines wordt dat gedeelte van het onderzoek beschreven, dat betrekking heeft op het vinden van die eiwitfractie waarin de activiteit van de antiperinucleaire factor kan worden aangetoond.

'Blokade'-proeven met specifieke antisera tegen de verschillende immunoglobulines, nl. een anti- γ_G -, anti- γ_A - en een anti- γ_M -globuline-serum wezen op de mogelijkheid dat de onderzochte activiteit in sommige sera in alle drie, in andere sera in de γ_G - of γ_M -immunoglobulines aanwezig was.

Op dezelfde wijze als met de 'blokkade'-proeven kon met de in dit hoofdstuk beschreven 'three-layer'-techniek de verdeling van de activiteit van de antiperinucleaire factor in de verschillende immunoglobulines worden aangetoond. Deze verdeling kon vervolgens weer worden bevestigd door proeven met geconjugeerde specifieke antisera tegen de drie immunoglobulines. Enkele sera gaven een afwijkende verdeling ten opzichte van het 'three-layer'-onderzoek. Een verklaring hebben we hiervoor niet.

De verkregen gegevens wijzen er op dat de activiteit van de antiperinucleaire factor in één of meer van de immunoglobuline fracties γ_G , γ_A en/of γ_M kan zijn gelokaliseerd.

In hoofdstuk v wordt het onderzoek naar het voorkomen en de aard van de intracellulaire granula beschreven.

Het bleek dat de perinucleaire fluorescentie gevende korreltjes alleen werden gevonden in menselijke wangslimvliesepitheelcellen en niet in een groot aantal andere onderzochte cellen en weefsels, zoals menselijke vagina epitheelcellen, kraakbeen- of synovia-weefsel, dierlijke wangepitheelcellen, lever-, nier- en schildklier- of bijnierweefsel.

De mogelijkheden dat de granula uit intracellulaire structuren of uit micro-organismen bestaan werden besproken. Een van de mogelijkheden was dat de granula de zg. keratohyaline granula zouden zijn. Verder zouden het lysosomen kunnen zijn of eventueel pleuropneumonie-achtige organismen.

Voor geen van deze drie mogelijkheden werd een bewijs gevonden. De korreltjes zijn basofiel, gramnegatief, ze bevatten fosfo- of glycolipoiden en mogelijk ook zure mucopolysacchariden. Ze zijn Feulgen-negatief en kleuren niet met methylgroen pyronine. Na RNase en DNase behandeling blijft de fluorescentie aanwezig. Er zijn overeenkomsten in kleurreactie tussen de granula en PPLO. Aan de eventuele identiteit met PPLO en lysosomen worden in hoofdstuk VI nog enige beschouwingen gewijd.

In hoofdstuk VI worden enkele pathogenetische aspecten van de reumatoïde artritis besproken en de mogelijke betekenis hierbij van de antiperinucleaire factor.

Een overzicht wordt gegeven van enkele antistoffen die bij de reumatoïde artritis zijn beschreven en die zouden kunnen wijzen op een auto-immuun genese van de ziekte, zoals de reumafactoren, de antikernfactoren en antistoffen tegen andere celcomponenten dan de kernen. Vervolgens wordt, na een kort overzicht over de lysosomen, waarschijnlijk gemaakt dat de voor de perinucleaire fluorescentie verantwoordelijke korrels niet identiek zijn aan de zure fosfatase bevattende lysosomen. De mogelijkheid blijft aanwezig dat ze overeenkomen met zg. 'residual bodies'.

De gedachte dat de granula overeen zouden komen met PPLO kon niet worden bewezen. Hoewel de sera die met verschillende PPLO stammen reageerden ook vrijwel alle de antiperinucleaire factor bezaten, bleek dat specifieke antisera tegen PPLO geen perinucleaire fluorescentie gaven. De aanwezigheid van identieke substanties in de granula en de PPLO is echter niet uitgesloten.

In hoofdstuk VII wordt de betekenis van de antiperinucleaire factor besproken. Voor de diagnostiek van reumatoïde artritis is onderzoek naar de aanwezigheid van de antiperinucleaire factor van belang gezien de grote mate van specificiteit van de factor voor deze ziekte, terwijl ook het voorkomen van de factor in sommige gevallen bij patienten met overigens negatieve reumareacties de diagnose reumatoïde artritis met meer zekerheid kan doen stellen. De groep sero-negatieve reumatoïde artritis patienten wordt op deze wijze verkleind.

De betekenis van de antiperinucleaire factor voor het inzicht in de pathogenese van reumatoïde artritis blijft onderwerp voor speculaties.

SUMMARY

In this thesis an investigation of the nature and the incidence of a new serum factor discovered in certain patients is reported.

In chapter I the techniques are described. The indirect immunofluorescence method introduced by Coons was applied to human sera, using fresh unfixed human buccal epithelial cells as the substrate and conjugated rabbit antihuman globulin.

Sera of some patients gave a brilliant fluorescence of cytoplasmic particles with a size of 0,5-4 μ , lying around the nuclei. This characteristic speckled picture was described as perinuclear fluorescence (PNF). The serum factor responsible for this phenomenon, which was entirely reproducible in our hands, was called antiperinuclear factor (APF).

In chapter II the incidence of the antiperinuclear factor in various groups of patients and control groups is reported.

The results are summarized in table I.

Nearly all of the sera containing this factor had been obtained from patients suffering from rheumatoid arthritis. About half of the rheumatoid arthritis patients were found to have this factor in their serum, while it was detected in about one percent of the other investigated groups. Patients suffering from Addisonian pernicious anemia and relatives of rheumatoid arthritis patients however possibly have the factor in a somewhat higher percentage (3-6%).

In chapter III the results are described of a search for possible correlations between the occurrence of the antiperinuclear factor in rheumatoid arthritis patients and certain clinical and laboratory features of the disease. The antiperinuclear factor was distributed equally between males and females and also between the different age groups. A clearly positive correlation was established between the presence of the antiperinuclear

TABLE 1. The occurrence of the antiperinuclear factor in sera from different patient- and control groups.

	Sera from patients with:	No. of sera	No. APF positive
1	1. rheumatoid arthritis (Groningen)	105	51
	2. ankylosing spondylitis	54	1
	3. systemic lupus erythematosus	12	1
	4. rheumatic fever	10	—
	5. degenerative joint disease	21	—
	6. psoriatic arthritis	5	—
	7. primary macroglobulinemia	6	—
	8. gamma A-myeloma	4	—
	9. gamma G-myeloma	8	1 (1) ¹
	10. scleroderma	10	—
	11. Sjögren's Syndrome	3	—
	12. Reiter's Syndrome	5	—
	13. pernicious anemia	50	3
2	rheumatoid arthritis (Amsterdam)	248	113
3	1. atypical virus pneumonia (posit. coldagglutinins)	101	4 (2) ¹
	2. thyroid disorders (posit. thyroid antibodies)	16	—
	3. diabetes mellitus (negat. thyroid antibodies)	97	4 (2) ¹
4	active pulmonary tuberculosis	100	—
5	population Schiermonnikoog	431	4 (3) ¹
6	elderly people	196	3
7	relatives of RA patients	695	24 (8) ¹

¹ numbers of sera in parenthesis were derived from persons also having rheumatoid arthritis.

factor and that of rheumatoid (RA) factors and of rheumatoid nodules.

In patients with these nodules the APF was found more often than the RA factors.

Chapter IV consists of a report concerning the nature of the antiperinuclear factor. The results obtained suggest that a relatively heat-resistant component of the serum complement is required for the reaction between the antiperinuclear factor and the intracellular granules.

Blocking experiments showed that the activity of the antiperinuclear factor could be in the three immunoglobulin fractions IgG, IgA and IgM. This was confirmed by applying a three layer technique (BARNETT C.S., 1964) as well as by the use of conjugated antisera with specific affinity for

the immunoglobulin fractions. Some of the antiperinuclear positive sera gave different results in the different procedures. At present an explanation cannot be given for this.

The available data however indicate that antiperinuclear factor activity may be present in one or more of the three investigated immunoglobulin fractions.

In chapter v studies about the nature of the intracellular granules in the human buccal epithelium involved in the immunofluorescence phenomenon are reported. Perinuclear fluorescence could be detected only when the substrate consisted of human buccal mucosal cells. With other cells of human or animal origin this type of fluorescence did not occur. We used: human vaginal epithelial smears, human cartilage and synovial sections and sections from rheumatoid nodules. Further were used dog-, rabbit- and guinea pig buccal mucosal epithelial cells, kidney-, liver-, stomach sections and buccal mucosal epithelial smears from *Macacus Rhesus*.

Three possible hypotheses about the nature of the granules showing fluorescence were considered: these bodies could be keratohyaline granules, pleuropneumonia-like organisms (PPLO or mycoplasma) or lysosomes. Definitive evidence in favor of any of these possibilities was not obtained. The granules which are basophilic, contain phospho- or glycolipids and possibly also acid muco-polysaccharides. In stained preparations they do not take up Gram's stain. They are Feulgen-negative and do not stain with methylgreenpyronine. The granules are resistant to treatment with desoxyribonuclease and ribonuclease. There are similarities in staining characteristics between the granules and mycoplasma.

In chapter vi some aspects of the pathogenesis of rheumatoid arthritis, especially the relationship of the antiperinuclear factor to the development of the disease, are discussed.

The occurrence of the various other humoral antibodies commonly associated with this disease such as the RA factors, antinuclear factors and antibodies against cellular constituents other than nuclei are also mentioned.

A brief review of the nature of the lysosomes and their possible significance in rheumatoid arthritis is given.

Though it was established that the granules responsible for the PNF phenomenon do not contain acid phosphatase and are therefore not identical with lysosomes, the possibility that these granules are similar to the 'residual bodies' has not been excluded.

It was not possible to identify the granules as a mycoplasma, even though nearly all of the investigated RA sera reacting with various PPLO strains gave perinuclear fluorescence.

The presence of antigenically related compounds in both PPLO and the granules has not been excluded.

In chapter VII the significance of the antiperinuclear factor is discussed. The demonstration of its presence has diagnostic value, because of the high degree of specificity of this antibody for rheumatoid arthritis.

The finding of the perinuclear fluorescence is especially useful when one deals with patients with rheumatoid arthritis who lack the RA-factors. The 'seronegative group' is therefore decreased.

While the detection of the antiperinuclear factor is of practical value, the theoretical significance of the phenomenon is at present only a subject for speculation.